



|              |                                                                                                                                                       |
|--------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Title        | Vitamin K deficiency leads to exacerbation of murine dextran sulfate sodium-induced colitis                                                           |
| Author(s)    | 白石, 衣里                                                                                                                                                |
| Citation     | 大阪大学, 2016, 博士論文                                                                                                                                      |
| Version Type |                                                                                                                                                       |
| URL          | <a href="https://hdl.handle.net/11094/55768">https://hdl.handle.net/11094/55768</a>                                                                   |
| rights       |                                                                                                                                                       |
| Note         | やむを得ない事由があると学位審査研究科が承認したため、全文に代えてその内容の要約を公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、<a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">大阪大学の博士論文について</a>をご参照ください。 |

*The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA*

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

## 論文内容の要旨

## Synopsis of Thesis

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |                                                                                                                              |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 氏名<br>Name                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             | 白石 衣里                                                                                                                        |
| 論文題名<br>Title                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          | Vitamin K deficiency leads to exacerbation of murine dextran sulfate sodium-induced colitis<br>(マウスDSS腸炎はVitamin K欠乏により増悪する) |
| 論文内容の要旨                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |                                                                                                                              |
| 〔目的(Purpose)〕                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |                                                                                                                              |
| <p>炎症性腸疾患 (IBD) 患者では低栄養やステロイド治療等による骨密度の減少が問題になるが、Vitamin K欠乏は骨密度低下の要因である。IBD患者でVitamin K欠乏の指標である低カルボキシル化オステオカルシン (ucOC) が高値となり、ucOCはクローン病患者の疾患活動性と相関していることを報告した (Nakajima S, <i>et al. Nutrition</i> 2011)。Vitamin K欠乏によりLPS誘導性肝障害が増悪した報告はあるが、Vitamin Kが消化管の炎症に関与しているか否かの報告はなく、Vitamin K欠乏と消化管粘膜炎症の関係を明らかにすることを本研究の目的とした。</p>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |                                                                                                                              |
| 〔方法ならびに成績(Methods/Results)〕                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |                                                                                                                              |
| <p>Vitamin Kを欠乏させた飼料を投与した欠乏群と、Vitamin Kを75mg/kg含有した飼料を投与した添加群に分けて飼育し、7日間2%DSSを経口投与し、体重、腸管長、組織学的腸炎スコアを比較検討した。また、大腸粘膜固有層単核球 (LPL) と脾細胞を回収し、ELISA・qRT-PCR・フローサイトメトリーを用いてサイトカインを測定・比較検討した。Vitamin K欠乏群は添加群に比し、有意に体重減少・腸管長の短縮を認め、組織学的腸炎スコアはVitamin K欠乏群は添加群に比し、有意に高値であり炎症は重症であった。LPLのIL-6産生はVitamin K欠乏群で高値であった。CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>細胞の割合、IL-10産生、Foxp3発現はVitamin K欠乏群と添加群で差を認めなかった。次にin vitroの検討を行った。脾細胞と脾細胞からMACSを用いて分離したCD11b<sup>+</sup>, CD19<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>細胞それぞれに、Vitamin Kを添加する群としない群に分けて培養し、ELISA・qRT-PCRを用いてIL-6とTNF-<math>\alpha</math>の発現を比較検討した。また、IL-6の細胞内染色を行い、フローサイトメトリーで解析を行った。Vitamin K存在下で、脾細胞、特にCD19<sup>+</sup>細胞のIL-6蛋白・mRNA産生が有意に抑制された。IL-6の細胞内染色の結果、Vitamin K存在下でIL-6産生CD19<sup>+</sup>細胞のみならずCD19<sup>+</sup>細胞全体の減少が認められた。さらに、腸炎モデルマウスにおけるIL-6産生CD19陽性細胞に対するVitamin K欠乏の影響を解析した。DSS腸炎を作成後、LPLを回収し、フローサイトメトリーを用いてIL-6産生CD19陽性の割合をvitamin K欠乏群と添加群で比較検討した。Vitamin K欠乏群は添加群と比して、LPLのIL-6産生CD19陽性細胞の割合が有意に多いことが確認された。最後にVitamin Kによるアポトーシス誘導への影響を検討した。脾細胞からMACSを用いてCD19細胞とCD19以外の細胞を分離した後、Vitamin Kを添加する群としない群に分けて培養し、AnnexinV・PIをフローサイトメトリーで解析した。また、Caspase3/7活性を測定した。その結果、Vitamin K存在下でCD19陽性細胞のAnnexinV陽性かつPI陰性細胞の割合が増加し、さらにCaspase3/7 活性も増加した。DSS腸炎モデルでも検討を行った。脾細胞を回収し、CD19、AnnexinV・PIを染色し、フローサイトメトリーを用いて解析したところ、Vitamin K添加群において欠乏群に比して有意にannexinV陽性・PI陰性細胞の割合が多くVitamin KによるCD19<sup>+</sup>B細胞分画のアポトーシス誘導が確認された。</p> |                                                                                                                              |
| 〔総括(Conclusion)〕                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |                                                                                                                              |
| <p>Vitamin K存在下ではCD19陽性B細胞にアポトーシスが誘導され、過剰なIL-6の産生が抑制されるが、Vitamin K欠乏状態では、CD19陽性B細胞のアポトーシスは誘導されず、IL-6産生による粘膜障害が誘導されることが示唆された。Vitamin K欠乏を防ぐことが、IL-6をターゲットとした新たな治療戦略として有望であると考えられる。</p>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |                                                                                                                              |

論文審査の結果の要旨及び担当者

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |     |        |           |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|--------|-----------|
| (申請者氏名)                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |     | 白石 孝 里 |           |
| 論文審査担当者                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      | (職) | 氏 名    |           |
|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              | 主 査 | 大阪大学教授 | 竹 原 徹 郎   |
|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              | 副 査 | 大阪大学教授 | 竹 田 潔     |
|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              | 副 査 | 大阪大学教授 | 下 村 啓 一 郎 |
| 論文審査の結果の要旨                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |     |        |           |
| <p>本研究は、炎症性腸疾患患者でVitamin K欠乏が認められ、Vitamin K欠乏の程度と炎症性腸疾患の活動性が相関することを背景に、Vitamin K欠乏と消化管粘膜炎症の関係をマウスの炎症性腸疾患モデルを用いて明らかにしたものである。本研究では、デキストラン硫酸ナトリウム（DSS）により誘導した腸炎モデルマウスを作成し、Vitamin K欠乏飼料投与群とVitamin K添加飼料投与群に分け比較検討したところ、Vitamin K欠乏群は添加群に比しDSS腸炎は増悪し、大腸粘膜固有層単核球におけるIL-6産生増加がみられた。In vitroでVitamin Kを添加すると、CD19陽性細胞のIL-6産生が濃度依存的に低下し、IL-6産生CD19陽性細胞のみならずCD19陽性細胞全体の減少が認められた。Vitamin KによるCD19陽性細胞のアポトーシス誘導への影響を検討したところ、Vitamin K添加によりCD19陽性細胞でのアポトーシス促進が示された。また、DSS腸炎モデルにおいて、Vitamin K添加群でCD19陽性大腸粘膜固有層単核球のIL-6産生が減少していることが確認された。すなわち、Vitamin K存在下ではCD19陽性B細胞にアポトーシスが誘導され、過剰なIL-6の産生が抑制されるが、Vitamin K欠乏状態では、CD19陽性B細胞のアポトーシスは誘導されず、IL-6産生による粘膜障害が誘導されることが示された。</p> <p>これらの研究の結果は、Vitamin Kの免疫担当細胞における新たな機能を明らかにしたものであり、腸管炎症におけるVitamin Kの役割を明確に示したものである。炎症性腸疾患の治療戦略を考える上でも重要な研究であり、学位に値すると思う。</p> |     |        |           |